

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>A01N 65/00, A61K 7/48, 7/06</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/10656</b> <b>(43) Date de publication internationale: 19 mars 1998 (19.03.98)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/01603 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 11 septembre 1997 (11.09.97)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 96/11149 12 septembre 1996 (12.09.96) FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> ALGUES ET MER (S.A.R.L.) [FR/FR]; Kernigou, F-29242 Ile d'Ouessant (FR).  <b>(72) Inventeur; et</b> <b>(75) Inventeur/Déposant (US seulement):</b> MOIGNE, Jean-Yves [FR/FR]; Kerinec, F-29242 Ile d'Ouessant (FR).  <b>(74) Mandataire:</b> BORIN, Lydie; Cabinet Ballot-Schmit, 16, avenue du Pont Royal, F-94230 Cachan (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> USE OF ALGAE EXTRACT AS ANTIBACTERIAL AND/OR ANTIFUNGAL AGENT AND COMPOSITION CONTAINING SAME  <b>(54) Titre:</b> UTILISATION D'UN EXTRAIT D'ALGUES EN TANT QU'AGENT ANTIBACTERIEN ET/OU ANTIFONGIQUE ET COMPOSITION COMPORTANT UN TEL EXTRAIT  <b>(57) Abstract</b>  The invention concerns the use of a purified algae extract for obtaining a composition with antibacterial and/or antifungal activity. The extract is obtained by a method comprising the following steps: releasing the intracellular contents of algae cells and purifying by filtration said intracellular contents so as to obtain a purified filtering permeate, said extract comprising a molecular fraction having halogenated organic molecules with a molecular weight more than 10,000.  <b>(57) Abrégé</b>  L'invention concerne une utilisation d'un extrait d'algues clarifié pour l'obtention d'une composition à activité antibactérienne et/ou antifongique. L'extrait est obtenu selon un procédé comportant les étapes de libération du contenu intracellulaire des cellules des algues et de clarification par filtration dudit contenu intracellulaire en vue d'obtenir un perméat de filtration clarifié, ledit extrait comportant une fraction moléculaire possédant des molécules organiques halogénées ayant un poids moléculaire supérieur à 10,000.		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

UTILISATION D'UN EXTRAIT D'ALGUES EN TANT QU'AGENT  
ANTIBACTERIEN ET/OU ANTIFONGIQUE ET COMPOSITION  
COMPORTANT UN TEL EXTRAIT.

L'invention concerne un extrait d'algues comportant des composés organiques halogénés, et une utilisation de cet extrait en tant qu'agent antibactérien, bactériostatique ou bactéricide, et/ou antifongique, fongistatique ou fongicide.

Certaines algues sont connues pour posséder une activité antibactérienne ou antifongique. Il s'agit notamment des Rhodophycées mais aussi des Chlorophycées et des Phéophycées. Parmi les Rhodophycées, les algues de la famille des Bonnemaisoniaceées et, en particulier, les algues de l'espèce *Asparagopsis*, sont connues pour posséder une activité antibactérienne et antifongique remarquable. A ce sujet, on se rapportera au document intitulé "Algues fixées de la côte atlantique française contenant des substances antibactériennes et antifongiques" (J.F. Biard et coll., *Planta medica*, *Journal of medicinal plant research*, 1980, supplément, pages 136-151).

*Asparagopsis Armata* est une algue marine le plus souvent épiphyte originaire d'Australie ou de Nouvelle Zélande. Cette algue est présente dans l'hémisphère nord depuis les années 1920 et on peut la trouver en Angleterre, en Irlande, en France, en Espagne, en Italie et au Maroc où elle forme toutefois des populations très clairsemées et instables à des profondeurs allant jusqu'à dix mètres. C'est l'une des raisons pour lesquelles une exploitation industrielle des composés organiques halogénés que comportent ces

algues, prélevées par cueillette dans leur milieu naturel, n'a pas été envisagée.

Une autre raison est donnée dans un article intitulé "Halogen chemistry of the red alga Asparagopsis" (Olivier Mc Connell and William Fenical, 5 Phytochemistry, 1977, vol.16, pages 367-374). Les composés organiques halogénés des algues, qui seraient, selon les auteurs de cet article, à l'origine de leur activité antibactérienne et antifongique, comportent 1 à 4 atomes de carbone et sont très volatils. C'est 10 pourquoi ces auteurs ne proposent qu'une méthode d'extraction complexe de ces composés, mise en oeuvre en laboratoire, avec entraînement des molécules volatiles dans un courant d'air chaud suivie d'une 15 extraction dirigée multi-solvants.

Or, le demandeur a développé une technique de culture par microbouturage décrite dans la demande française déposée le 22 mars 1995 sous le numéro 95.03577. Grâce à cette technique, il est possible 20 d'obtenir rapidement une quantité importante d'algues Asparagopsis exploitable industriellement.

Considérant ce qui précède, un problème que se propose de résoudre l'invention est d'obtenir un extrait d'algues clarifié à partir d'un procédé qui 25 puisse être mis en oeuvre industriellement sur une quantité d'algues importante, et de l'utiliser pour l'obtention d'une composition à activité antibactérienne et/ou antifongique.

Une solution à ce problème consiste à effectuer une 30 clarification par filtration du contenu intracellulaire des algues de manière à obtenir un perméat comportant une fraction moléculaire possédant des molécules ayant un poids moléculaire supérieur à 10.000, ladite

fraction étant à l'origine, du moins en partie, de l'activité antibactérienne et/ou antifongique.

En définitive, l'invention a pour objet une utilisation d'un extrait d'algues clarifié pour  
5 l'obtention d'une composition à activité antibactérienne et/ou antifongique, ledit extrait étant obtenu selon un procédé comportant des étapes de libération du contenu intracellulaire des cellules des algues et de clarification par filtration dudit contenu  
10 intracellulaire en vue d'obtenir un perméat de filtration clarifié, ledit extrait comportant une fraction moléculaire possédant des molécules organiques halogénées ayant un poids moléculaire supérieur à 10.000.

15 Par ailleurs, un tel extrait peut être utilisé pour l'obtention d'une composition cosmétique et/ou pharmaceutique.

La description qui va suivre ne comporte aucun caractère limitatif. Elle est rédigée relativement à  
20 l'exemple de l'algue rouge (Rhodophycée) *Asparagopsis Armata* de la famille des *Bonnemaisoniaceae*. Toutefois, il est bien entendu que l'invention s'étend à toute espèce d'algues comprenant des composés organiques intracellulaires halogénés.

25 *Asparagopsis Armata* est une algue pluricellulaire dont certaines cellules ou vésicules de ces cellules comportent une forte quantité de composés halogénés, notamment bromés et iodés.

Parmi les composés organiques halogénés d'*Armata Asparagopsis*, on citera les composés suivants, les  
30 poids moléculaires desdits composés étant indiqués entre parenthèses :

- halométhanés :  $\text{CHBr}_3$  (253),  $\text{CH}_3\text{I}$  (142),  $\text{CH}_2\text{ClI}$  (176),  $\text{CHCl}_3$  (119),  $\text{CCl}_4$  (152),  $\text{CHBrCl}_2$  (163),  $\text{CHBr}_2\text{Cl}$  (208),  $\text{CBr}_4$  (332),  $\text{CHBr}_2\text{I}$  (220) ;
- haloacétones :  $\text{CH}_2\text{Br-CO-CH}_2\text{Cl}$  (171),  $\text{CH}_2\text{Br-CO-CH}_2\text{Br}$  (216),  $\text{CHBr}_2\text{-CO-CH}_2\text{Cl}$  (250),  $\text{CHBrCl-CO-CH}_2\text{Br}$  (250),  $\text{CHBr}_2\text{-CO-CH}_2\text{Br}$  (295),  $\text{CHBr}_2\text{-CO-CHBrCl}$  (329),  $\text{CHBr}_2\text{-CO-CHBr}_2$  (374),  $\text{CH}_2\text{Br-CO-CH}_3$  (137),  $\text{CHBr}_2\text{-CO-CH}_3$  (216),  $\text{CHCl}_2\text{-CO-CHBrCl}$  (229),  $\text{CHBr}_2\text{-CO-CHCl}_2$  (285),  $\text{CHBrCl-CO-CHBrCl}$  (284),  $\text{CHCl}_2\text{-CO-CHCl}_2$  (196) ;
- haloisopropanols :  $\text{CHBr}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{Br}$  (297),  $\text{CHBr}_2\text{-CHOH-CHBr}_2$  (373) ;
- haloacétates :  $\text{CH}_2\text{I-COO-CH}_3$  (200),  $\text{CHBr}_2\text{-COO-CH}_3$  (232),  $\text{CHBr}_2\text{-COO-C}_2\text{H}_5$  (246),  $\text{CHBrI-COO-C}_2\text{H}_5$  (283) ; et
- acides acryliques halogénés :  $\text{CBr}_2\text{=CH-COOH}$  (230),  $\text{CBr}_2\text{=CH-COO-CH}_3$  (244),  $\text{CHBr=CH-COO-C}_2\text{H}_5$  (169),  $\text{CHBr=CI-COO-C}_2\text{H}_5$  (292).

On notera cependant que d'autres composés organiques halogénés ont été signalés dans des algues de la même famille. Ces composés sont présents, dans lesdites algues, en quantité variable selon l'espèce voire, pour une même espèce, selon les lots récoltés.

Pour l'obtention de l'extrait de l'invention, on a cultivé et récolté *Asparagopsis Armata* selon une méthode du type de celle décrite dans la demande française précitée déposée le 22 mars 1995 sous le numéro 95.03577 et dont le contenu est incorporé aux présentes par citation de référence.

L'algue fraîche récoltée est alors conditionnée dans des emballages étanches et vides d'air.

Ces emballages sont congelés à une température de congélation inférieure à  $0^\circ\text{C}$ , en pratique de l'ordre de  $-18^\circ\text{C}$ . A cette température, l'eau libre contenue dans les cellules des algues, et dans les vésicules que comportent ces cellules, est cristallisée. Comme la

température de congélation est atteinte de manière lente, les cristaux ainsi formés sont volumineux et provoquent un début d'éclatement des cellules de l'algue.

5 Les étapes précitées de conditionnement et de congélation sont avantageusement réalisées dès que possible, après la récolte. De ce fait, les pertes de composés organo-halogénés volatils sont limitées.

10 Les algues conditionnées et congelées peuvent être conservées et stockées congelées pendant un temps relativement long, plusieurs années en pratique.

Lorsque l'on souhaite obtenir un extrait selon l'invention, on effectue tout d'abord un broyage des algues congelées afin d'obtenir, par effet de cisaillement dû aux cristaux de glace, un éclatement cellulaire avancé. Ce broyage est arrêté dès que la température atteint 0°C.

20 Au dessus de 0°C, une maturation des algues dans leur emballage se produit. En effet, des enzymes des algues dégradent les carraghénanes (dépolymérisation) et autres composés gélifiants présents dans les algues et la matière intracellulaire des cellules des algues se liquéfie.

25 C'est la raison pour laquelle une maturation à basse température, 4°C au maximum, est ensuite pratiquée pendant un temps t, par exemple 200 heures, afin d'obtenir une dégradation enzymatique naturelle de polysaccharides sans perte de l'activité objet de l'invention.

30 Ensuite, on effectue un broyage extrêmement fin des algues maturées de manière que les cellules et vésicules desdites algues éclatent et que l'on obtienne un broyat dans lequel le contenu intracellulaire et intravésiculaire des algues est libéré.

Cette dernière étape de broyage, ainsi que les étapes ultérieures d'obtention de l'extrait de l'invention, sont réalisées à température dirigée inférieure à 10°C, préférentiellement de l'ordre de 4°C.

Il est préférable d'ajuster la quantité de matière sèche du broyat à une valeur au plus égale à 8 % en poids. En pratique, la quantité de matière sèche dans un tel broyat est de l'ordre de 10 à 11 % en poids. Aussi, on ajoute 30 % d'eau. Le rendement d'extraction du contenu cellulaire est ainsi optimisé.

Une centrifugation du broyat est alors effectuée par exemple sur Jouan KR 4-22 à 4500 g pendant 15 min. On obtient une partie résiduaire et un surnageant. La partie résiduaire, essentiellement constituée d'une phase solide, comporte les parois membranaires des cellules des algues. Le surnageant, qui comporte la matrice intracellulaire et, de ce fait, les composés organiques halogénés, est récupéré.

Ce surnageant, dont le pH est d'environ 5,94, est alors préférentiellement acidifié avec de l'acide citrique à une valeur comprise entre 2 et 5, par exemple 3,35.

Il est ensuite clarifié par filtration. A cet effet, on effectue avantageusement une microfiltration tangentielle dudit surnageant. Le seuil de clarification est de l'ordre de 1,5  $\mu\text{m}$ . Au-dessus de cette valeur, il n'y a pas de clarification. Au-dessous, les composés responsables de l'activité de l'extrait de l'invention sont filtrés et la quasi-totalité de l'activité présente initialement dans le surnageant est récupérée, en définitive, à une valeur de l'ordre de 1,4  $\mu\text{m}$ , qui correspond d'ailleurs à peu près au seuil de clarification.



Avec cette étape de microfiltration, et sans étape préalable de séchage ou de mise en solution dans des solvants et d'évaporation, on obtient, selon l'invention, un extrait d'algues clarifié liquide, limpide, et d'une couleur légèrement jaunâtre.

Des essais ont été effectués avec cet extrait en vue d'évaluer ses propriétés antibactérienne et antifongique sur différentes souches bactériennes, levures ou moisissures. Les résultats de ces essais sont rassemblés dans le tableau suivant, dans lequel on a mesuré, pour chaque souche bactérienne, la réduction de population à 20 ou 32°C et à 5, 30 ou 60 minutes. On notera qu'une réduction de  $10^5$  correspond à une réduction dite de 5 log requise par les normes en vigueur.

	20°C	20°C	20°C	32°C	32°C	32°C
	5 min.	30 min.	60 min.	5 min.	30 min.	60 min.
<i>Vibrio anguillarum</i>	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$]10 ; 10^3]$	$]10^3 ; 10^5]$	$> 10^5$	$]10^3 ; 10^5]$	$> 10^5$	$> 10^5$
<i>Escherichia coli</i>		$]10 ; 10^3]$	$]10 ; 10^3]$			$> 10^5$
<i>Enterobacter gergoviae</i>			$]10 ; 10^3]$			$> 10^5$

Staphylococcus aureus			$10^3$ ; $10^5$			$> 10^5$
Candida albicans			$10^3$ ; $10^5$			$> 10^5$

Ainsi que cela est montré par ce tableau, l'activité antibactérienne de l'extrait est avérée sur les souches bactériennes *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter gergoviae*, *Staphylococcus aureus* ainsi qu'une activité antifongique sur la souche *Candida albicans* avec un optimum de temps de contact de 60 minutes au maximum.

Une analyse de l'extrait de l'invention montre qu'il comporte 2,03 % en poids de matière sèche obtenue à 120 °C, 21,2 % en poids de ladite matière sèche, calculés à 550°C, étant formés de matière organique. L'analyse de la composition de cette matière sèche a donné les résultats suivants, exprimés en g/kg de matière sèche :

15	Protides	68,9
	Sucres réducteurs	53,7
	Mannitol	63,0
	Sodium	256
	Potassium	30,5
20	Calcium	12,8
	Magnésium	13,2
	Plomb	0,50
	Cadmium	0,25
	Zinc	38,5
25	Arsenic	6,0
	Cuivre	6,0
	Mercure	< 0,25
	Sélénium	< 2,5

Soufre ( $\text{SO}_4$ ) 55,1.

En outre, un dosage des halogènes (iode, chlore, brome) présents dans l'extrait a donné les résultats suivants, toujours exprimés en g/kg de matière sèche :

5 Iode total (inorganique et organique) 8,4  
Chlorures 426  
Brome total (inorganique et organique) 120,5

10 A noter que les résultats ci-dessus, ainsi que la plupart des résultats donnés ci-après, sont fonction des lots d'algues étudiés. Toutefois, il existe une cohérence entre les résultats obtenus, quels que soient ces lots.

15 Dans une analyse complémentaire, un échantillon de 33 ml d'extrait de l'invention, extrait dans 4 ml d'hexane, a donné les résultats suivants, exprimés en mg/l :

20  $\text{CHBr}_2\text{Cl}$  0,36  
 $\text{CHBr}_3$  39,4  
 $\text{CH}_2\text{I}_2$  0,12  
 $\text{CHBr}_2\text{I}$  8,4  
 $\text{CHBrI}_2$  0,4  
 $\text{CHI}_3$  0,3

25 Il apparaît donc que, dans l'extrait de l'invention, le bromoforme  $\text{CHBr}_3$  est largement majoritaire, même si le dibromo-iodo-méthane est présent en quantité importante. A un niveau très inférieur, on trouve d'autres micromolécules halogénées.

30 En vue de contrôler que l'activité antibactérienne et/ou antifongique est bien liée à un ensemble de molécules halogénées de faible poids moléculaire, on a préparé une solution aqueuse de bromoforme à 60 mg/l et comparé son activité à celle d'un perméat de nanofiltration au seuil de 400 Daltons ne renfermant

donc que des micromolécules, halogénées notamment. Après avoir effectué des inclusions de 1 ml et 0,1 ml sur milieu PCA pendant 48 heures d'une solution mère renfermant le produit à tester et la souche *Pseudomonas aeruginosa* à la concentration de  $1,9 \cdot 10^8$ , on a obtenu

5 des résultats consignés dans le tableau suivant :

t	inclusions	Bromoforme 60 mg/l	Perméat 400 D
48 heures	1 ml	>>	0
	0,1 ml	>>	$2,0 \cdot 10^2$

Dans ce tableau, ainsi que dans les tableaux qui suivent, ">>" signifie que les bactéries se sont développées et sont incomptables.

10 Il apparaît donc que le bromoforme seul, à la concentration de 1,5 fois celle observée dans l'extrait, n'a pas d'activité à l'encontre de la souche *Pseudomonas aeruginosa*. Par contre, le perméat de nanofiltration à 400 D est actif contre cette souche le

15 second jour suivant sa fabrication. On peut en déduire que l'activité du perméat à 400 D est due à l'action synergique des micromolécules halogénées, même présentes à l'état des traces.

Par ailleurs, on a fractionné le perméat de

20 microfiltration en lui faisant subir une ultrafiltration (uF) ou une nanofiltration (nF) et en mesurant, pour chaque fraction, à différents temps, l'activité antibactérienne vis à vis de la souche *Pseudomonas* selon le protocole défini ci-dessus. On a

25 obtenu les résultats suivants :

		Extrait	Rét. uF	Perm. uF	Rét. nF	Perm. nF
t=2 jours	1 ml	0	0	0	0	0
	0,1 ml	$1,0 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^2$
	s.m.	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$
t=1 mois	1 ml	0	0	$5 \cdot 10^1$	0	0
	0,1 ml	0	0	$1,3 \cdot 10^3$	0	0
	s.m.	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$
t=2 mois	1 ml	0	0	>>	0	>>
	0,1 ml	$1,0 \cdot 10^4$	0	>>	0	>>
	s.m.	$1,2 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$

Le seuil de l'ultrafiltration correspond à des molécules de 10.000 D et celui de la nanofiltration, à des molécules de 400 D. De ce qui précède, on constate que les fractions perméats de l'ultrafiltration et de la nanofiltration perdent rapidement leur activité, en moins de 2 mois, alors que les réténats conservent leur activité. Par ailleurs, des analyses pratiquées sur ces lots ont montré une concentration en iode organique supérieure dans les réténats. On peut donc en déduire que l'activité de l'extrait serait générée par des macromolécules de poids moléculaire supérieur à 10.000 dont la nature n'est pas clairement identifiée à ce jour. Il est probable que ces molécules soient des complexes protéines-polysaccharides renfermant du brome et de l'iode notamment.

Ces macromolécules joueraient le rôle de matrice de réserve. Une dégradation naturelle, peut-être

enzymatique desdites macromolécules, aboutirait à la formation de micromolécules halogénées responsables de l'activité. Cela a été confirmé par des essais complémentaires dans lesquels on a montré que l'extrait  
 5 vieilli comporte 6 fois plus de bromoforme que l'extrait non vieilli et 70 fois plus de dibromo-iodo-méthane.

Les micromolécules halogénées ont un poids moléculaire inférieur à 400. Leur présence dans les  
 10 perméats d'ultrafiltration et de nanofiltration explique l'activité attestée de ces fractions pendant un temps court. Ces micromolécules se dégradent en effet par la suite en halogénures, en particulier, iodures et bromures inorganiques.

15 D'autres essais ont été effectués de manière à mesurer l'influence du pH sur l'activité de l'extrait et sur son vieillissement. L'acidification a été effectuée au cours de l'étape dite d'acidification du procédé d'obtention de l'extrait selon l'invention, par  
 20 l'acide citrique. Les résultats de ces essais sur la souche *Pseudomonas* sont contenus dans le tableau suivant :

		pH = 3,35	pH = 4,04	pH = 5,94
t = 2 jours	1 ml	0	0	0
	0,1 ml	0	0	0
	s.m.	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$
t = 1 mois	1 ml	0	0	0
	0,1 ml	$2,2 \cdot 10^3$	0	$3,3 \cdot 10^4$
	s.m.	$2,4 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$

t = 2 mois	1 ml	0	0	0
	0,1 ml	$1,6 \cdot 10^4$	$2,7 \cdot 10^4$	>>
	s.m.	$3,2 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$
t = 3 mois	1 ml	0	0	0
	0,1 ml	0	$2,0 \cdot 10^4$	>>
	s.m.	$3,0 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^8$
t = 4 mois	1 ml	0	40	0
	0,1 ml	$3,0 \cdot 10^4$	>	>>
	s.m.	$3,5 \cdot 10^8$	$2,9 \cdot 10^8$	$2,9 \cdot 10^8$
t = 5 mois	1 ml	0	0	$1,5 \cdot 10^2$
	0,1 ml	0	$10^5$	>>
	s.m.	$1,8 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^8$
t = 13 mois	1 ml	0		
	0,1 ml	$2 \cdot 10^4$		
	s.m.	$3,6 \cdot 10^8$		

L'activité de l'extrait de l'invention se conserve en milieu acide avec un optimum à pH = 3,35. Ainsi, une acidification à une valeur de pH comprise entre 2 et 5, préférentiellement de l'ordre de 3,35, freinerait la dégradation de la matrice et entraînerait une libération lente des actifs halogénés. En outre, cette acidification stabiliserait les micromolécules halogénées qui s'accumulent dans le milieu et maintiennent l'activité pendant plus de 13 mois.

Selon l'invention, l'extrait est utilisé, dans des compositions cosmétiques et/ou pharmaceutiques, comme bactéricide ou bactériostatique, ou fongicide ou fongistatique. L'extrait est en fait bactéricide ou bactériostatique, fongicide ou fongistatique selon sa concentration dans la composition cosmétique et/ou pharmaceutique et selon les souches bactériennes ou

selon les levures ou moisissures auxquelles il s'applique.

Les compositions cosmétiques ci-après, données à titre d'exemples, permettront de mieux apprécier la diversité des formulations cosmétiques dans lesquelles l'extrait de l'invention peut être introduit. Dans ces exemples, les noms commerciaux des produits utilisés sont, le cas échéant, écrits entre parenthèses, les quantités des produits étant exprimées en % en poids.

10 Exemple 1 : Emulsion-gel

	(Eumulgin B1)	2,5
	Glycéryl stéarate (Cutina GMS)	2,5
	Huile minérale (Vaseline)	4,0
	(Cire Lanol CTO)	2,0
15	Cyclométhicone (Abil K4)	1,5
	Huile d'amande douce	1,5
	Carbomère (Carbopol 2001)	0,5
	Triéthanolamine	0,5
	Glycérine	3,0
20	Extrait algual (CLMO2)	1,0
	Extrait de l'invention	7,0
	(Solubilisant LRI)	0,5
	Parfum	0,3
	Colorant	qs
25	Eau	qsp 100

Exemple 2 : Lotion-gel

	(Dermol L-45)	0,5
	Extrait algual, propylène glycol,	
	eau (CLMO2)	1,0
30	Extrait algual, propylène glycol,	
	eau (FCO2)	0,5
	Sodium PCA, sodium lactate, fructose,	
	collagène	1,0
	Extrait de l'invention	7,0



15

	PPG-26 butéth-26, huile de castor (Solubilisant LRI)	0,5
	Parfum	0,3
	Colorant	qs
5	Acide citrique	qs
	Eau	qsp 100

Exemple 3 : Shampooinq

	Sodium lauréth sulfate (Texapon N70)	5,0
	Sodium lauréth sulfate, lauryl	
10	polyglucose (Plantaren PS10)	5,0
	Cocoamidopropylbétaine (Dehyton K)	4,0
	Cocoamide DEA, lauréth-12 (Comperlan LS)	1,0
	(Glutamate DOE 120)	0,5
	Lauryl méthyl glucéth-10 hydroxypropyl	
15	dimonium chloride (Glucquat 125)	0,5
	Glycérine	3,0
	Extrait algual, propylène glycol, eau (CLM02)	1,0
	Extrait de l'invention	7,0
20	Glycérides PEG-6 caprilique/caprique (Softigen 767)	2,0
	Parfum	0,3
	Chlorure de sodium	0,2
	Colorant	qs
25	Acide citrique	qs
	Eau	qsp 100

Dans les compositions ci-dessus, on notera que l'Eumulgin B1 est un éther polyéthylène glycol de l'alcool cétéaryl dont la formule générale est  $R(OCH_2-CH_2)_nOH$  où R représente un mélange de groupes alkyles dérivés de l'alcool céthyl et stéaryl et n a une valeur moyenne de 12 ; que la cire Lanol CTO est formée, d'une part, d'un mélange d'alcool gras constitué principalement d'alcool céthyl et stéaryl et, d'autre

part, d'un éther polyéthylène glycol de l'alcool  
cétéaryl dont la formule générale est  $R(OCH_2CH_2)_nOH$  où  
R représente un mélange de groupes alkyles dérivé de  
l'alcool céthyl et stéaryl et n a une valeur moyenne de  
5 33 ; que le solubilisant LRI est un polyoxypropylène,  
polyoxéthylène éther de l'alcool butyle de formule  
générale  $C_4H_9(OCH_2CH_2)_x(OCH_2CH_2)_yOH$  où x et y ont une  
valeur moyenne de 26 ; que le Dermol L-45 est un ester  
de l'acide lactique possédant un éther polyéthylène  
10 glycol de glycérine, contenant une moyenne de 7 moles  
d'oxyde d'éthylène ; que le Déhyton K est un zwitterion  
de formule  $RCONH(CH_2)_3N^+(CH_3)_2CH_2COO^-$  où RCO représente  
la fonction acide gras dérivée de l'huile de coco ; que  
le Comperlan LS est un mélange d'éthanolamides d'acides  
15 de noix de coco de formule générale  $RCON(CH_2CH_2OH)_2$  où  
RC représente la fonction acide gras dérivée de l'huile  
de coco et d'un éther polyéthylène glycol du lauryl  
alcool de formule  $CH_3(CH_2)_{10}CH(OCH_2CH_2)_nOH$  ; que le  
Glucamate DOE120 est un éther polyéthylène glycol du  
20 diester d'acide oléique et du méthyle glucose avec en  
moyenne 120 moles d'oxyde d'éthylène ; que le Glucquat  
125 est un sel d'ammonium quaternaire provenant de la  
réaction entre un méthyle gluceth-10 et un diméthyl  
dodécylammonium époxide ; et que le Softigen 767 est un  
25 glycéride éthoxylé de formule générale  
 $RCOOCH_2CHOHCH_2(OCH_2CH_2)_nOH$  où RCO est un mélange de  
radicaux caprylic et capric et n a une valeur moyenne  
de 6.

En outre, des essais ont été effectués de manière à  
30 déterminer l'efficacité de la protection des formules  
cosmétiques de base par l'extrait à la concentration de  
7 % vis à vis du développement dans le temps des germes  
aérobies mésophiles ou par des levures ou moisissures,  
en l'absence de tout autre conservateur. Ces essais

mesurent le nombre de germes présents à différents temps en jours à température ambiante ou à 45°C. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant.

		J=0 T=20°C	J=15 T=20°C	J=30 T=45°C
Emulsion-gel	germes aérobies mésophiles	70	10	<10
	levures moisissures	<10 <10	<10 <10	<10 <10
Lotion-gel	germes aérobies mésophiles	<10	10	<10
	levures moisissures	<10 <10	<10 <10	<10 <10
Shampoing	germes aérobies mésophiles	<10	<10	<10
	levures moisissures	<10 <10	<10 <10	<10 <10

5 Ces résultats montrent l'effet bactériostatique et fongistatique de l'extrait de l'invention inclus dans les compositions cosmétiques en exemple et montrent que cet effet se conserve dans le temps, la stabilisation de l'extrait étant suffisante (1 mois à 45°C correspond à 1 an de vieillissement naturel). A noter que, sans

10

l'extrait, le nombre de colonies aurait été de l'ordre de 60.000 voire 500.000 selon les germes.

Dans les exemples qui viennent d'être décrits, l'extrait selon l'invention était utilisé en tant  
5 qu'ingrédient technique d'une composition cosmétique afin de protéger cette-dernière contre des risques de contaminations microbiennes et de limiter, voire même supprimer, l'utilisation de conservateurs chimiques.

Cependant, d'autres formes d'utilisations de  
10 l'extrait selon l'invention peuvent être envisagées. Ainsi, l'extrait d'algues selon l'invention peut être incorporé, sous forme de concentré, dans une composition cosmétique et/ou pharmaceutique non  
15 seulement pour protéger cette composition contre les risques de contaminations microbiennes, mais aussi en tant que produit actif. En effet, selon sa concentration dans la composition cosmétique, l'extrait selon l'invention peut agir, de manière sélective,  
20 contre certaines bactéries ou certains champignons responsables de phénomènes désagréables tels que l'apparition de pellicules sur le cuir chevelu ou d'acné sur les peaux jeunes par exemple.

Des essais ont été effectués avec un concentré de l'extrait d'algues clarifié selon l'invention sur  
25 différentes souches bactériennes ou levures afin d'évaluer son activité fongicide et bactéricide. Lors de ces essais, une souche bactérienne ou levure a été mise en contact avec une solution, contenant le concentré de l'extrait, pendant précisément 30 minutes  
30 et 60 minutes. Après ce contact, des inclusions de 1 ml et 0,1 ml d'une solution mère renfermant le concentré à tester et la souche microbienne ont été effectuées sur milieu PCA. Les résultats de ces essais sont rassemblés dans le tableau ci-dessous, dans lequel on a mesuré,

pour chaque souche microbienne, la population après un temps de contact de 30 minutes et de 60 minutes et pour une concentration du concentré de l'extrait variant d'un facteur 10.

	Temps de contact	solution mère	0,1 ml	1 ml
Pityrosporum ovale	30 min	$8,8 \cdot 10^6/\text{ml}$	$2,8 \cdot 10^4/\text{ml}$	0
	60 min	$8,8 \cdot 10^6/\text{ml}$	$2,6 \cdot 10^4/\text{ml}$	0
Staphylococcus aureus	30 min	$1,9 \cdot 10^8/\text{ml}$	$2 \cdot 10^3/\text{ml}$	0
	60 min	$1,9 \cdot 10^8/\text{ml}$	$2 \cdot 10^3/\text{ml}$	0
Staphylococcus epidermidis	30 min	$2,5 \cdot 10^8/\text{ml}$		0

La levure pityrosporum ovale est l'une des principales causes microbiennes d'apparition et de développement de pellicules sur le cuir chevelu.

5 On observe un abattement de population parfait (de 6 Log) dans l'inclusion de 1 ml et ce quel que soit le temps de contact. Cette réduction de population est supérieure à la réduction de 5 Log requise par les normes en vigueur. Par conséquent, dans une inclusion  
10 de 1 ml, le concentré de l'extrait selon l'invention présente une activité fongicide à l'égard de la levure pityrosporum ovale.

En revanche, pour une inclusion de 0,1 ml, c'est à dire pour une dilution d'un facteur 10 du concentré de  
15 l'extrait d'algues clarifié selon l'invention, l'activité de cet extrait est plus limitée ( la réduction de population étant de 2 Log), et elle est de type fongistatique.

Ce résultat prouve que l'extrait selon l'invention, à certaines concentrations, peut détruire ou inhiber le développement de la levure pityrosporum ovale. Cet extrait peut donc être utilisé pour son activité  
5 fongicide dans des produits capillaires de traitement pour détruire les pellicules et pour son activité fongistatique dans des produits capillaires d'entretien pour prévenir l'invasion par les pellicules.

Les souches bactériennes aérobie staphylococcus aureus et staphylococcus epidermidis, associées à la  
10 levure pityrosporum ovale et aux souches bactériennes anaérobie propionibacterium acnes et propionibacterium granulosum, sont les principales causes microbiennes responsables des problèmes sur peaux jeunes et  
15 notamment des problèmes d'acné.

Pour les souches staphylococcus aureus et staphylococcus epidermidis, on observe également un abattement de population parfait (de 8 Log) dans une inclusion de 1 ml à partir d'un temps de contact de 30  
20 minutes. De plus, en ce qui concerne la souche staphylococcus aureus, pour une inclusion de 0,1 ml, c'est à dire pour une dilution d'un facteur 10 du concentré de l'extrait d'algues testé, l'activité fongicide de cet extrait est toujours avérée sur cette  
25 souche puisque l'on observe un abattement de population de 5 Log qui correspond au minimum requis par les normes en vigueur.

En ce qui concerne l'étude de l'activité d'un concentré de l'extrait selon l'invention sur la souche  
30 bactérienne anaérobie propionibacterium acnes, les essais ont été effectués selon un protocole différent. En effet, dans ce cas, on fait croître la souche bactérienne en milieu anaérobie, sur un milieu liquide M20 pendant 7 jours à 25°C. La souche est ensuite

inoculée en milieu aérobie. La population d'une souche  
essai ayant été mise en contact avec un concentré de  
l'extrait de l'invention pendant une durée de 24 heures  
est ensuite comparée à la population d'une souche  
5 témoin n'ayant pas été mise en contact avec ce  
concentré. Les résultats de cet essai sont rapportés  
dans le tableau ci-dessous.

Propionibacterium acnes	Solution mère	Temps de contact 24 heures
Témoin	$8.10^8$	$6.10^5$
Essai	$6.10^8$	$5.10^1$

Ces résultats prouvent que le concentré de  
l'extrait de l'invention présente un effet bactéricide  
10 à l'égard de la souche propionibacterium acnes (on  
observe une réduction de population de 7 Log) lorsque  
le temps de contact est relativement long, c'est à dire  
d'au moins 24 heures. Le fait que l'activité  
bactéricide est constatée après un temps de contact  
15 relativement long signifie que, dans ce cas, les actifs  
halogénés de l'extrait sont libérés de manière  
progressive. L'effet bactéricide du concentré de  
l'extrait est donc avéré sur propionibacterium acnes,  
après un temps de contact relativement long, mais il  
20 est moins prononcé que sur staphylococcus aureus,  
staphylococcus epidermidis et pityrosporum ovale.

En revanche, l'extrait d'algues selon l'invention  
ne semble pas avoir développé jusqu'à ce jour  
d'activité bactéricide sur la cinquième souche  
25 bactérienne mise en cause dans l'apparition de l'acné,  
à savoir la souche bactérienne anaérobie  
propionibacterium granulosum.

En conséquence, un concentré de l'extrait de l'invention, à certaines concentrations, présente une activité bactéricide et bacteriostatique à l'encontre de quatre souches microbiennes sur cinq habituellement  
 5 mises en cause dans le domaine des peaux jeunes à problèmes et notamment dans le domaine des problèmes d'acné.

A partir de ces résultats, une utilisation de l'extrait selon l'invention en tant que produit actif  
 10 dans une composition cosmétique, et même pharmaceutique, peut être envisagée.

Les compositions cosmétiques et pharmaceutiques, ci-après données à titre d'exemples, permettront de mieux apprécier la diversité des formulations dans  
 15 lesquelles un concentré de l'extrait de l'invention peut être introduit en tant que produit actif. Dans ces exemples, les noms commerciaux des produits utilisés sont, le cas échéant, écrits entre parenthèses, les quantités des produits étant exprimées en % en poids.

20

**Exemple 4 : Crème antiacnéique**

	prévention	traitement
Eau	53,65	48,65
25 Propylène glycol	15,00	15,00
PEG-8(Lutrol E 400)	5,00	5,00
Tetrasodium EDTA		
(Edeta B poudre)	0,05	0,05
Triéthanolamine	0,20	0,20
30 Acide stéarique	3,00	3,00
Huile de coco hydrogénée	2,00	2,00
polysorbate 60	1,80	1,80
Stéarate de sorbitan	1,20	1,20
huile de germes		



23

	de blé pure	0,50	0,50
	Stéarate de PEG-100 et glyceryl stéarate	1,30	1,30
	Huile de vaseline	10,50	10,50
5	DL $\alpha$ tocopherol	0,50	0,50
	concentré de l'extrait de l'invention	5,00	10,00

Exemple 5 : Fluide antiacnéique

		prévention	traitement
10	Eau	65,95	60,95
	Tetrasodium EDTA (Edeta B poudre)	0,05	0,05
	Acide citrique	0,05	0,05
15	Gomme xanthane	0,30	0,30
	Ceteareth-25 (crémophor A25)	2,00	2,00
	Steareth-7 (Lamecrème SA7)	5,00	5,00
20	Stearate de glycérine SE	3,00	3,00
	Myristate d'isopropyle	11,80	11,80
	Lanolin (Stellux AI)	1,00	1,00
	Squalane (Cosbiol)	5,00	5,00
	DL $\alpha$ tocopherol	0,50	0,50
25	Concentré de l'extrait de l'invention	5,00	10,00
	Fragrance (Acacia 887)	0,35	0,35

Exemple 6 : Gel antiacnéique

		prévention	traitement
30	Eau	87,20	82,20
	Carbomère (polmère LL)	0,40	0,40
	PEG-8 (Lutrol E400)	2,00	2,00

24

Propylène glycol	5,00	5,00
Triethanolamine	0,40	0,40
concentré de l'extrait de l'invention	5,00	10,00

5

Exemple 7 : Gel Tonique antipelliculaire

	prévention	traitement
Eau	92,00	87,00
10 Carraghénanes (Carraghénate X2)	3,00	3,00
concentré de l'extrait de l'invention	5,00	10,00

15

Exemple 8 : Lotion antipelliculaire

	prévention	traitement
Eau	57,90	52,90
Huile de castor hydrogénée PEG-40	0,50	0,50
20 Fragrance	0,30	0,30
Ethanol	30,00	30,00
Panthenol	0,50	0,50
concentré de l'extrait de l'invention	5,00	10,00

25

Exemple 9 : Shampoing antipelliculaire

	prévention	traitement
Eau	60,65	55,65
sodium lauréth sulfate	25,00	25,00
30 Linoleamide DEA	2,00	2,00
Collagène hydrolysé de potassium cocoyl	1,50	1,50
cocamidopropylbétaine	3,00	3,00

25

	Tetrasodium EDTA	0,20	0,20
	Acide citrique	0,15	0,15
	Chlorure de sodium	2,50	2,50
	concentré de l'extrait		
5	de l'invention	5,00	10,00

Dans toutes ces formulations, aucun conservateur n'a été ajouté car le concentré de l'extrait de l'invention est utilisé non seulement en tant que produit actif mais aussi pour son rôle d'auto-protection de la composition contre des contaminations microbiennes.

Bien entendu, il est possible d'obtenir des dérivés de l'extrait en modifiant ses qualités physico-chimiques où sa concentration. De tels dérivés, qui possèdent une activité antibactérienne ou antifongique, restent dans le cadre de l'objet revendiqué de l'invention.

## REVENDEICATIONS

1. Utilisation d'un extrait d'algues clarifié pour l'obtention d'une composition à activité antibactérienne et/ou antifongique, ledit extrait étant obtenu selon un procédé comportant les étapes de libération du contenu intracellulaire des cellules des algues et de clarification par filtration dudit contenu intracellulaire en vue d'obtenir un perméat de filtration clarifié, ledit extrait comportant une fraction moléculaire possédant des molécules organiques halogénées ayant un poids moléculaire supérieur à 10.000.

2. Utilisation d'une fraction moléculaire d'un extrait d'algues clarifié pour l'obtention d'une composition à activité anti-bactérienne et/ou antifongique, ledit extrait étant obtenu selon un procédé comportant les étapes de libération du contenu intracellulaire des cellules des algues et de clarification par filtration dudit contenu intracellulaire en vue d'obtenir un perméat de filtration clarifié, les molécules de ladite fraction ayant un poids moléculaire supérieur à 10.000, des molécules de ladite fraction étant des molécules organiques halogénées.

3. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la filtration est effectuée à une valeur proche du seuil de clarification.

4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que la filtration est une microfiltration effectuée à une valeur de l'ordre de

1,4  $\mu\text{m}$  et en ce que la valeur du seuil de clarification est de l'ordre de 1,5  $\mu\text{m}$ .

5           5. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'extrait est obtenu selon un procédé comportant en outre une étape de congélation des algues après leur récolte à une température de congélation à laquelle l'eau libre contenue dans les cellules de l'algue est cristallisée, la température de congélation étant  
10 atteinte de manière lente, un début d'éclatement des cellules de l'algue étant alors provoqué.

          6. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'extrait est obtenu par un procédé comportant en outre l'étape suivante de  
15 broyage des algues congelées de manière à obtenir un broyat dans lequel les cellules desdites algues sont éclatées.

          7. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'extrait est  
20 obtenu selon un procédé comportant en outre une étape de dégradation des composés gélifiants des algues en réalisant une maturation des algues à une température supérieure à 0°C pendant un temps t en heures, par exemple 200 heures.

25           8. Utilisation selon l'une des revendications 6 et 7, caractérisée en ce que l'extrait est obtenu par un procédé comportant en outre une étape d'ajustement de la quantité de matière sèche dans le broyat à une valeur au plus égale à 8 % en poids.

30           9. Utilisation selon l'une des revendications 6 à 8, caractérisée en ce que l'extrait est obtenu selon un procédé comportant en outre une étape de centrifugation du broyat en vue d'obtenir un

surageant comportant l'activité antibactérienne et antifongique.

10. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'extrait est  
5 obtenu selon un procédé comportant en outre une étape d'acidification à une valeur de pH comprise entre 2 et 5, préférentiellement de l'ordre de 3,35.

11. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que les algues sont  
10 des Bonnemaisoniacées, en particulier, Asparagopsis Armata.

12. Utilisation selon l'une des revendications précédentes pour l'obtention d'une composition cosmétique et/ou pharmaceutique.

13. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que l'extrait est en outre  
15 incorporé, sous forme de concentré, dans une composition cosmétique ou pharmaceutique en tant que produit actif.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 97/01603

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 A01N65/00 A61K7/48 A61K7/06		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 90, Philadelphia, PA, US; abstract no. 312461, XP002032483 see abstract & BANDARA ET AL.: "Antimicrobial activity of some marine algae" J NATL SCI COUNC SRI LANKA, vol. 16, no. 2, 1988, pages 209-222, <div style="text-align: center;">--- -/-</div>	1-13
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.</span> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search  <div style="text-align: center;">21 October 1997</div>		Date of mailing of the international search report  <div style="text-align: center;">27. 10. 97</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <div style="text-align: center;">Fort, M</div>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCI/FR 97/01603

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 82, Philadelphia, PA, US; abstract no. 159831, XP002032484 see abstract & CHENIEUX ET AL.: "Seaweeds of the french atlantic coast with anti mitotic compounds" PLANT MED O (SUPPL), 1980, pages 152-162, ---	1-13
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 80, Philadelphia, PA, US; abstract no. 153462, XP002032485 see abstract & HENRIQUEZ ET AL.: "Antibiotic properties of marine algae 2. Screening of chilean marine algae for anti microbial activity" BOT MAR, vol. 22, no. 7, 1979, pages 451-454, ---	1-13
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 95, Philadelphia, PA, US; abstract no. 489453, XP002032486 see abstract & MAHASNEH ET AL.: "Antibiotic activity of marine algae against multi-antibiotic resistant bacteria" MICROBIOS, vol. 83, no. 334, 1995, pages 23-26, ---	1-13
X	MC. CONNELL ET AL.: "Halogen Chemistry of the red Alga Asparagopsis" PHYTOCHEMISTRY, vol. 16, 1977, pages 367-374, XP002032482 cited in the application *le document entier* ---	1-13
X	WO 84 02652 A (LABORATOIRES GOEMAR) 19 July 1984 see claims 1-9 see page 23; table X see page 1, line 1 - page 4, line 13 ---	1-13

-/--



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCI/FR 97/01603

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 95-011755 XP002032488 see abstract &amp; JP 06 298 661 A</p> <p>-----</p>	1-13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/FR 97/01603

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8402652 A	19-07-84	FR 2538683 A	06-07-84
		FR 2538682 A	06-07-84
		FR 2555451 A	31-05-85
		BR 8307671 A	11-12-84
		EP 0160650 A	13-11-85
		JP 4024330 B	24-04-92
		JP 60500290 T	07-03-85
		US 4897266 A	30-01-90
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demr Internationale No  
PC1/FR 97/01603

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 A01N65/00 A61K7/48 A61K7/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 A01N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 90, Philadelphia, PA, US; abstract no. 312461, XP002032483 voir abrégé &amp; BANDARA ET AL.: "Antimicrobial activity of some marine algae" J NATL SCI COUNC SRI LANKA, vol. 16, no. 2, 1988, pages 209-222,</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-13

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

**\* Catégories spéciales de documents cités:**

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 octobre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27. 10. 97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fort, M

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No  
PCI/FR 97/01603

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 82, Philadelphia, PA, US; abstract no. 159831, XP002032484 voir abrégé &amp; CHENIEUX ET AL.: "Seaweeds of the french atlantic coast with anti mitotic compounds" PLANT MED O (SUPPL), 1980, pages 152-162,</p>	1-13
X	<p>--- BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 80, Philadelphia, PA, US; abstract no. 153462, XP002032485 voir abrégé &amp; HENRIQUEZ ET AL.: "Antibiotic properties of marine algae 2. Screening of chilean marine algae for anti microbial activity" BOT MAR, vol. 22, no. 7, 1979, pages 451-454,</p>	1-13
X	<p>--- BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 95, Philadelphia, PA, US; abstract no. 489453, XP002032486 voir abrégé &amp; MAHASNEH ET AL.: "Antibiotic activity of marine algae against multi-antibiotic resistant bacteria" MICROBIOS, vol. 83, no. 334, 1995, pages 23-26,</p>	1-13
X	<p>--- MC. CONNELL ET AL.: "Halogen Chemistry of the red Alga Asparagopsis" PHYTOCHEMISTRY, vol. 16, 1977, pages 367-374, XP002032482 cité dans la demande *le document entier*</p>	1-13
X	<p>--- WD 84 02652 A (LABORATOIRES GOEMAR) 19 juillet 1984 voir revendications 1-9 voir page 23; tableau X voir page 1, ligne 1 - page 4, ligne 13</p>	1-13
	---	

-/--

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. internationale No  
PCT/FR 97/01603

.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 95-011755 XP002032488 voir abrégé &amp; JP 06 298 661 A</p> <p>-----</p>	1-13

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à : membres de familles de brevets

Dem. Internationale No

PCT/FR 97/01603

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 8402652 A	19-07-84	FR 2538683 A	06-07-84
		FR 2538682 A	06-07-84
		FR 2555451 A	31-05-85
		BR 8307671 A	11-12-84
		EP 0160650 A	13-11-85
		JP 4024330 B	24-04-92
		JP 60500290 T	07-03-85
		US 4897266 A	30-01-90
-----			